

(11)特許出願公開番号

特開平6-141899

(43)公開日 平成6年(1994)5月24日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	7823-4B		
C 1 2 N 15/00	A	8931-4B		
15/10				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
// (C 1 2 Q 1/04				

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-317920

(22)出願日 平成4年(1992)11月4日

(71)出願人 000002196
 サッポロビール株式会社
 東京都中央区銀座7丁目10番1号

(72)発明者 土屋 陽一
 静岡県焼津市岡当日10番地 サッポロビ
 ル株式会社醸造技術研究所内

(72)発明者 狩野 幸信
 静岡県焼津市岡当日10番地 サッポロビ
 ル株式会社醸造技術研究所内

(74)代理人 弁理士 久保田 藤郎

(54)【発明の名称】 乳酸菌の高感度検出法

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 乳酸菌を含む検体より、乳酸菌のDNAを抽出し、この抽出物をrRNAを共沈物として用い、エタノール沈澱処理することにより乳酸菌のDNAを回収する。このDNAに対して下記の配列群の少なくとも1つを有するか又は該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う。

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-
3'

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-
3'

【効果】 ビールなどの食品中に含まれる乳酸菌を非常に高感度、かつ短時間に検出することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の工程よりなる乳酸菌の高感度検出法。

(1) 乳酸菌を含む検体をポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて汙過する工程、(2) 該フィルターを、揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させた後、揮発性溶液を蒸発させる工程、(3) 上記工程で得た検体試料をlysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSで処理することによ

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' (a)

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' (b)

【請求項2】 揮発性溶液が、エタノールである請求項1記載の方法。

【請求項3】 プライマーが、請求項1記載の各オリゴヌクレオチドの配列のうち、少なくとも連続した10塩基以上を含むオリゴヌクレオチドである請求項1記載の方法。

【請求項4】 PCRを行う際に、Pfu Polymeraseを使用する請求項1記載の方法。

【請求項5】 乳酸菌の検出を、ポリアクリルアミド電気泳動またはアガロース電気泳動および臭化エチジウムによる核酸染色により行う請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、乳酸菌の迅速かつ高感度な検出法に関し、詳しくは食品、特にビールの品質に悪影響を及ぼす*Lactobacillus brevis*をはじめとする乳酸菌の検出法に関するものである。

【0002】

【従来の技術と発明が解決しようとする課題】食品、特にビール製造において、乳酸菌はその耐酸性と耐アルコール性から最も重要な有害菌である。そのため、ビールなどの食品中から該乳酸菌を迅速かつ高感度に検出する方法の開発が要望されている。かかる要望に応えるべく我々は研究を重ね、既に特願平3-191114号にお

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' (a)

5' -GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' (b)

【0004】検体中の極少数の微生物の検出をPCRを用いて行うことを考えた場合、まず初めに検体の容量（通常は数百ml）をいかに効率よく減らしてPCRにかけられるような数十μlという容量にするかということが問題となる。そこで、本発明においては、まずポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて検体を汙過し乳酸菌を捕獲する。ここで、フィルターの材質であるポリカーボネートとしては特に制限はないが、ビスフェノール系のものが好ましい。フィルターは、膜厚が100μ以下、孔径が1μ以下、特に0.6μ以下のものが好適である。従来は、主に親水性ポリフッ化ビニリデン系メンブランフィルターが使用されていたが、乳酸菌の回収率が十分とは言えなかった。ポリカーボネート製メン

* って乳酸菌のDNAを抽出する工程、(4) 上記工程で得た抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈殿処理することにより乳酸菌のDNAを回収する工程、

(5) 乳酸菌DNAに対して、以下の配列群の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う工程、

※いて、250mlのビール中にわずか30菌体の*L. brevis*を検出することが可能な方法を開示した。しかし、乳酸菌はわずか1菌体でも製品ビール中に混入すれば、やがて増殖して混濁を起こす可能性があることを考えれば、さらに高感度な乳酸菌の検出法が望まれる。そこで、本発明の目的は、前述の方法を上回る感度の乳酸菌の検出法を提供することにある。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記の工程よりなる乳酸菌の高感度検出法に関する。(1) 乳酸菌を含む検体をポリカーボネート製メンブランフィルターを用いて汉過する工程、(2) 該フィルターを、揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させた後、揮発性溶液を蒸発させる工程、(3) 上記工程で得た検体試料をlysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSで処理することによって乳酸菌のDNAを抽出する工程、(4) 上記工程で得た抽出物をtRNAを共沈物として用い、エタノール沈殿処理することにより乳酸菌のDNAを回収する工程、(5) 乳酸菌DNAに対して、以下の配列群の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPolymerase Chain Reaction (PCR)を行い、乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う工程、

★ランフィルターを用いることにより、乳酸菌の回収率を向上させることができる。

【0005】次に、汉過に用いたフィルターを揮発性溶液中で超音波処理を行って乳酸菌をフィルターより遊離させる。ここで、揮発性溶液は乳酸菌のDNAに損傷を与えないようなものであればよく、アルコール系、フェノール系などのヒドロキシル基含有化合物が好適であり、特にエタノールが好ましい。揮発性溶液中で超音波処理を行い菌体をフィルターより遊離させた後、エタノール等の揮発性溶液を蒸発させることにより検体の容量を短時間で減少させる。

【0006】次に、lysozyme, mutanolysin, proteinase KおよびSDSを用いることによって検体中より乳酸

菌のDNAを効率よく抽出する。エタノール沈澱処理によって乳酸菌のDNAを回収する際に、tRNAを共沈物として用いることによって回収率を高めることができる。【0007】さらに、PCRの効率を上げる手段として、ゲノム当たり複数個存在することが知られているrR*

5' -TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' (a)

5' -GCGTGGCAACGTCTTATCCT-3' (b)

【0008】なお、本発明ではPCRを行う際に、Taq Polymeraseよりも耐熱性と正確性に優れているPfu Polymeraseを使用することによって、一層効率よくPCRを行うことができる。PCRを行って乳酸菌に特異的な配列を増幅させたのち、乳酸菌の検出を行う。

【0009】乳酸菌の検出は、種々の方法により実施することができるが、本発明では例えば上記の酵素反応液をポリアクリルアミド電気泳動またはアガロース電気泳動にかけることにより行い、増幅されたヌクレオチド断片の存在とその長さを確認することができる。その結果から、検体中にプライマーが認識すべきヌクレオチドが存在しているか否かを判定できる。判定は、臭化エチジウムによる核酸染色により行う。この判定により、乳酸菌の有無を判定するのである。増幅されたヌクレオチド断片の検出には、他の電気泳動やクロマトグラフィーも有効である。

【0010】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例1

PCR用サンプルの調製

250mlのビールに様々な数の *L. brevis* JCM1059[†] を添加（菌数はコロニーカウント法により測定）した検体を、ポリカーボネート製メンブレンフィルター（直径47mm、膜厚10μm、孔径0.4μm、Millipore社製、アイソポアメンブレン）で吸引ろ過した後、該フィルターを10ml容のチューブに入れ、5mlのエタノールを添加する。超音波処理5分、振とう30分の後、フィルターを取り除き、チューブ内のエタノールを濃縮遠心機にて蒸発させた後、検体を100μlの滅菌水に溶かす。

【0011】次に、上記検体溶液に150μlの溶菌液A〔(1.67 M sucrose/0.8mg/ml lysozyme/16.8μg/ml mutanolysin) in 16.7 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)〕を添加し、37℃で30分処理した後、150μlの溶菌液B〔(13.3mM MgCl₂/2.7% triton X-100/2.7% diethyl pyrocarbonate/0.27mg/ml proteinase K/6.7% SDS) in 10 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)〕を

添加し、70℃で10分処理して溶菌を行った。その後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈澱処※

*NA遺伝子由来の配列をプライマーとして用いる。かかるプライマーとしては、以下の配列群の少なくとも1つを有するか、または該配列に対応する相補的配列を有するオリゴヌクレオチドがある。

※理を行って核酸成分を精製した。なお、エタノール沈澱処理の際に共沈物として500ngのtRNAを用いた。この後、10μlの緩衝液（10mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1mM EDTA）に溶かし、これをPCR用サンプルとした。

【0012】プライマーの合成

*L. brevis*の5S rRNA遺伝子の配列（Woese, C.R. et al., J. Mol. Evol. 8, 143-153 (1976)）から前記した配列(a), (b)を選び、それと同じ配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。なお、DNA合成および精製は宝酒造株式会社に委託した。

【0013】PCR

PCR用サンプルに、終濃度500nMのプライマー(a)および(b)、200μMのdNTPs および10X Pfu Polymerase用反応液（TOYOBO社製）を加えて全量を99.5μlとした。これを94℃で5分、45℃で5分処理した後、75℃に温度を維持しつつ1.25UのPfu Polymerase（TOYOBO社製）を添加した。この後、直ちに以下の条件でPCRを行った。なお、温度制御はTAITEC社製、TR-100を用いて行った。

【0014】熱変性：94℃、30秒

アニーリング：45℃、5秒

重合反応：75℃、10秒

以上を1サイクルとして40サイクル実施

【0015】検出

反応液から、増幅されたヌクレオチド断片を検出する方法として、縦型の5%ポリアクリルアミド電気泳動（Bio-Rad社製、Mini-PROTEAN II）を行った。PCR処理後の反応液から10μlを取り出し、泳動を行った。泳動は、TBE溶液（89mM Tris/89mM boric acid/2mM EDTA (pH 8.0)）を用い、300Vで6分を行った。その後、ゲルを臭化エチジウム溶液（0.5μg/ml）にて染色し、紫外線照射によって視覚化した。

【0016】結果

図1に示したように、ビールに1菌体の *L. brevis* を添加した場合、試験した9点中3点が陽性（正解率33%）となった。その他の菌数の場合、表1のような結果となった。

【0017】

【表1】

表1 L. brevis 添加 (1~9 cells/250ml of beer) 試験結果

菌数 (cells)	陽性となった数/試験した数	正解率 (%)
1	3/9	33
3	7/12	58
5	8/12	66
8	5/6	83
9	6/6	100

【0018】

【発明の効果】本発明の方法によれば、ビールなどの食品に含まれる乳酸菌を非常に高感度に検出することができる。しかも、本発明の方法に要する時間は、全工程で約11時間であり、従来の方法に比べ乳酸菌の検出に要する時間を大幅に短縮することができる。

*【図面の簡単な説明】

【図1】 L. brevis 添加 (菌数1個/ビール250ml) 試験結果を示す電気泳動写真である。矢印は、PCRによって増幅されたバンドを示し、このバンドが観察されるものを陽性 (+)、観察されないものを陰性 (-) とした。MはDNAサイズマーカーである。

【図1】



写真

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12R 1:225)

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The high sensitivity detecting method of the lactic acid bacteria which consist of the following process.

(1) The process which filters the specimen containing lactic acid bacteria using the membrane filter made from a polycarbonate, (2) After this filter's having ultrasonicated in the volatile solution and separating lactic acid bacteria from a filter, The process which evaporates an volatile solution, the process which extracts DNA of lactic acid bacteria by processing the specimen sample obtained at the (3) above-mentioned processes by lysozyme, mutanolysin, proteinase K, and SDS, (4) As opposed to the process and the (5) lactic acid bacteria DNA which collect DNA of lactic acid bacteria by carrying out ethanol precipitate processing of the extract obtained at the above-mentioned process, using tRNA as a coprecipitate Polymerase Chain Reaction (PCR) is performed by making into a primer the oligonucleotide which has at least one of the following array groups, or has a complementary sequence corresponding to this array. The process, 5'-TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' which perform detection of lactic acid bacteria after making lactic acid bacteria amplify a specific array (a) 5'-GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' (b)

[Claim 2] The approach according to claim 1 an volatile solution is ethanol.

[Claim 3] The approach according to claim 1 of being an oligonucleotide containing ten or more bases which the primer followed at least among the arrays of each oligonucleotide according to claim 1.

[Claim 4] The approach according to claim 1 of using Pfu Polymerase, in case PCR is performed.

[Claim 5] The approach according to claim 1 polyacrylamide electrophoresis or agarose electrophoresis, and the nucleic acid stain by the ethidium bromide perform detection of lactic acid bacteria.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the method of detecting lactic acid bacteria including *Lactobacillus brevis* which has a bad influence on food, especially the quality of Biel in detail about the detecting method [that lactic acid bacteria are quick and high sensitivity].

[0002]

[Description of the Prior Art] In food, especially the Biel manufacture, lactic acid bacteria are most important destructive funguses from the acid resistance and alcohol resistance. Therefore, it looks forward these lactic acid bacteria to quick and the development of an approach detected to high sensitivity out of food, such as Biel. We repeat research and it already sets to Japanese Patent Application No. No. 191114 [three to] in order to meet this request, and it is *L. brevis* of only 30 fungus bodies all over [of 250ml] Biel. The approach which can be detected was indicated. However, considering that it may increase soon and turbidity may be caused if lactic acid bacteria are mixed all over product Biel also by only 1 fungus body, a method of detecting still high sensitivity lactic acid bacteria is desired. Then, the purpose of this invention is to offer the method of detecting the lactic acid bacteria of the sensibility exceeding the above-mentioned approach.

[0003]

[Means for Solving the Problem] This invention relates to the high sensitivity detecting method of the lactic acid bacteria which consist of the following process. (1) The process which filters the specimen containing lactic acid bacteria using the membrane filter made from a polycarbonate, (2) After this filter's having ultrasonicated in the volatile solution and separating lactic acid bacteria from a filter, The process which evaporates an volatile solution, the process which extracts DNA of lactic acid bacteria by processing the specimen sample obtained at the (3) above-mentioned processes by lysozyme, mutanolysin, proteinase K, and SDS, (4) As opposed to the process and the (5) lactic acid bacteria DNA which collect DNA of lactic acid bacteria by carrying out ethanol precipitate processing of the extract obtained at the above-mentioned process, using tRNA as a coprecipitate Polymerase Chain Reaction (PCR) is performed by making into a primer the oligonucleotide which has at least one of the following array groups, or has a complementary sequence corresponding to this array. The process, 5'-TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' which perform detection of lactic acid bacteria after making lactic acid bacteria amplify a specific array (a)
5'-GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' (b)

[0004] When performing detection of the microorganism of the pole fraction in a specimen using PCR is considered, whether it is made the capacity several 10microl which reduces the capacity (usually hundreds of ml) of a specimen efficiently [how] first, and is applied to PCR poses a problem. Then, in this invention, a specimen is first filtered using the membrane filter made from a polycarbonate, and lactic acid bacteria are captured. Here, although there is especially no limit as a polycarbonate which is the quality of the material of a filter, the thing of a bisphenol system is desirable. 1micro or less of thickness of things 0.6micro or less is [especially a filter] suitable for 100micro or less and an aperture.

Although the hydrophilic polyvinylidene fluoride system membrane filter was mainly used conventionally, it was not able to be said that the recovery of lactic acid bacteria was enough. The recovery of lactic acid bacteria can be raised by using the membrane filter made from a polycarbonate. [0005] Next, the filter used for filtration ultrasonicates in an volatile solution, and lactic acid bacteria are separated from a filter. Here, hydroxyl content compounds, such as an alcoholic system and a phenol system, are suitable for an volatile solution, and especially its ethanol is [that what is necessary is just what does not do damage to DNA of lactic acid bacteria] desirable. After ultrasonication in an volatile solution and separating a fungus body from a filter, the capacity of a specimen is decreased by evaporating volatile solutions, such as ethanol, for a short time.

[0006] Next, DNA of lactic acid bacteria is efficiently extracted from the inside of a specimen by using lysozyme, mutanolysin, proteinase K, and SDS. In case ethanol precipitation processing recovers DNA of lactic acid bacteria, recovery can be raised by using tRNA as a coprecipitate.

[0007] Furthermore, the array of the rRNA gene origin by which recognizing plurality existence per genome is known as a means which gathers the effectiveness of PCR is used as a primer. There is an oligonucleotide which has at least one of the following array groups, or has a complementary sequence corresponding to this array as this primer.

5'-TGTGGTGGCGATAGCCTGAA-3' (a)

5'-GCGTGGCAACGTCCTATCCT-3' (b)

[0008] In addition, in this invention, in case PCR is performed, PCR can be performed much more efficiently by using Pfu Polymerase which excels Taq Polymerase in thermal resistance and accuracy. After performing PCR and making lactic acid bacteria amplify a specific array, detection of lactic acid bacteria is performed.

[0009] Although detection of lactic acid bacteria can be carried out by various approaches, in this invention, by covering the above-mentioned enzyme reaction liquid over polyacrylamide electrophoresis or agarose electrophoresis, it can carry out and existence of the amplified nucleotide fragment and its die length can be checked. It can judge whether from the result, the nucleotide which a primer should recognize exists in a specimen. The nucleic acid stain by the ethidium bromide performs a judgment. The existence of lactic acid bacteria is judged by this judgment. Other electrophoresis and chromatographies are also effective in detection of the amplified nucleotide fragment.

[0010]

[Example] Next, an example explains this invention in detail.

Various numbers to Biel of 250ml of preparation of the sample for example 1PCR *L.brevis* JCM1059T After carrying out suction filtration of the specimen added (number of microorganism is measured by the colony counting method) with the membrane filter made from a polycarbonate (the diameter of 47mm, 10micro of thickness, 0.4 micrometers of apertures, and Millipore shrine make, AISO pore membrane), this filter is put into the tube of 10ml **, and 5ml ethanol is added. After removing a filter after [of a shaking] 30 minutes and evaporating the ethanol in a tube with a concentration centrifuge for sonication 5 minutes, a specimen is melted to the sterilized water of 100microl.

[0011] Next the above-mentioned specimen solution -- lysate A of 150microl -- [() [1.67] M sucrose / 0.8mg/ml 16.8microg [lysozyme/]/ml mutanolysin in After adding 16.7 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)] and processing at 37 degrees C for 30 minutes, lysate B of 150microl -- [() [13.3mM] 2/2.7% of MgCl(s) triton X-100/2.7% diethyl pyrocarbonate / 0.27mg/ml proteinase K / 6.7% SDS in 10 mM potassiumphosphate buffer(pH 6.8)] was added, it processed at 70 degrees C for 10 minutes, and the bacteriolysis was performed. Then, a phenol/chloroform extraction, and ethanol precipitation processing were performed, and the nucleic-acid component was refined. In addition, tRNA of 500ng(s) was used as a coprecipitate on the occasion of ethanol precipitation processing. Then, it melted to the buffer solution (10 mM Tris-HCl/(pH 8.0)1mM EDTA) of 10microl, and this was made into the sample for PCR.

[0012] Synthetic *L.brevis* of a primer The array (a) and (b) which were described above from the array (Woese, C.R. et al., J.Mol.Evol.8,143-153 (1976)) of 5S rRNA gene It chose and chemosynthesis of the oligonucleotide with the same array as it was carried out. In addition, DNA synthesis and purification

were entrusted to TAKARA SHUZO CO., LTD.

[0013] the sample for PCR -- dNTPs of the primer (a) of final concentration 500nM and (b), and 200microM And the reaction mixture for 10X Pfu Polymerase (product made from TOYOBO) was added, and the whole quantity was set to 99.5microl. After processing this at 45 degrees C by 94 degrees C for 5 minutes for 5 minutes, Pfu Polymerase (product made from TOYOBO) of 1.25U was added maintaining temperature at 75 degrees C. Then, PCR was immediately performed on condition that the following. In addition, temperature control was performed using the product made from TAITEC, and TR-100.

[0014] Thermal denaturation: It is 40 cycle operation [0015], using 94 degrees C, 30 second annealing: 45 degree C, 5 second polymerization reaction: 75 degree C, and 10 seconds or more as 1 cycle. 5% polyacrylamide electrophoresis (Bio-Rad shrine make, Mini-PROTEAN II) of a vertical mold was performed as an approach of detecting the amplified nucleotide fragment from detection reaction mixture. 10microl was taken out from the reaction mixture after PCR processing, and migration was performed. Migration was performed by 300V for 6 minutes using the TBE solution (89mM Tris/89mM boric acid / 2mM EDTA (pH 8.0)). Then, the ethidium bromide solution (0.5microg/(ml)) dyed gel, and it visualized by UV irradiation.

[0016] a result -- drawing 1 -- having been shown -- as -- Biel -- L.brevis of one fungus body When it added, three points became a positivity (33% of rates of a correct answer) among nine examined points. In the case of other number of microorganism, a result as shown in Table 1 was brought.

[0017]

[Table 1]

表1 L. brevis 添加 (1~9 cells / 2.5 0ml of beer) 試験結果

菌数 (cells)	陽性となった数 / 試験した数	正解率 (%)
1	3 / 9	33
3	7 / 12	58
5	8 / 12	66
8	5 / 6	83
9	6 / 6	100

[0018]

[Effect of the Invention] According to the approach of this invention, the lactic acid bacteria contained in food, such as Biel, are very detectable to high sensitivity. And the time amount which the approach of this invention takes is about 11 hours at all processes, and can shorten sharply the time amount which detection of lactic acid bacteria takes compared with the conventional approach.

[Translation done.]